

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平2-62958

⑮ Int. Cl.<sup>5</sup>  
G 01 N 27/49

識別記号 庁内整理番号

⑬ 公開 平成2年(1990)3月2日

7363-2G G 01 N 27/46 3 0 6

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全4頁)

⑭ 発明の名称 リン酸濃度測定方法

⑯ 特 願 昭63-216767

⑰ 出 願 昭63(1988)8月30日

⑱ 発 明 者 刈 米 昭 夫 兵庫県尼崎市常光寺4丁目3番1号 神崎製紙株式会社神崎工場内

⑲ 発 明 者 林 隆 造 兵庫県尼崎市常光寺4丁目3番1号 神崎製紙株式会社神崎工場内

⑲ 発 明 者 橋 爪 義 雄 兵庫県尼崎市常光寺4丁目3番1号 神崎製紙株式会社神崎工場内

⑳ 出 願 人 神崎製紙株式会社 東京都千代田区神田小川町3丁目7番地

㉑ 代 理 人 弁理士 西教 圭一郎 外2名

明 細 書

1、発明の名称

リン酸濃度測定方法

2、特許請求の範囲

(1) グルコースオキシダーゼ、ムタロターゼ、インペルターゼおよびスクロースフオスフオリラーゼを固定化した酵素電極を用い、試料溶液にスクロースを共存せしめ測定することを特徴とするリン酸濃度測定方法。

(2) ピラノースオキシダーゼ、インペルターゼおよびスクロースフオスフオリラーゼを固定化した酵素電極を用い、試料溶液にスクロースを共存せしめ測定することを特徴とするリン酸濃度測定方法。

3、発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、試料中のリン酸を迅速かつ安価に測定可能な酵素電極に関するものである。

従来の技術

酵素電極は、その簡便性・迅速性等の優秀な特

性を有し、近年、臨床分析・食品分析・環境分析等の広範な分野で広く利用されるようになってきている。

従来酵素電極は、主として糖質、脂質、アミノ酸等の有機化合物を対象とするものを中心に開発されている。

一方、食品・環境試料中等の無機化合物は、人手による抽出・発色・比色操作等を伴う吸光分析法等を中心とする方法で測定されている。

この中で、リン酸は多くの食品試料・生体試料・環境試料等に含まれており、生体における代謝過程で重要な役割を演じ、また近年は河川・海洋における環境汚染物質の1つとしてその分析は重要な項目となつてきている。リン酸、特に、オルトリン酸の分析方法としては、モリブデン酸との反応により、リンモリブデン酸を形成させ、還元操作を行うことにより生じる青色を吸光光度分析法により定量するのが一般的である。この操作はかなりの操作手順を伴い、また試料中にタンパク質が含まれる場合は、除タンパク操作を必要とし、煩

雑なものである。さらにケイ酸による妨害等にも注意を払う必要があつた。

このような観点から、簡便性・迅速性に優れた酵素電極法をリン酸の定量に摘要すべく、アルカリフوسفターゼによる、グルコース-6-リン酸の加水分解反応に対して、リン酸が拮抗阻害を示すことを利用した電極が提案されている(G. Guilbault and M. Nanjo; Anal. Chim. Acta, 78, 69(1975))。しかしこの方法では、手軽に実行可能な測定系は組めるが、使用するグルコース-6-リン酸が高価で使い捨てにせざるを得ないという欠点があつた。

本発明が解決しようとする課題

本発明は、試料中のリン酸を測定するにあたり、高価な試薬を使用することなく、分析コストの低減が可能な、迅速性に優れた酵素電極を提案せんとするものである。

課題を解決するための手段

本発明に係わる酵素電極は、グルコースオキシダーゼ(EC: 1. 1. 3. 4)、ムタロターゼ

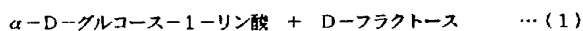
(EC: 5. 1. 3. 3)、インペルターゼ(EC: 3. 2. 1. 26)およびスクロースフオリラーゼ(EC: 2. 4. 1. 7)を固定化した構成を有し、測定時に、試料溶液にスクロースを共存せしめ測定することの特徴とするものである。また本発明は、ピラノースオキシダーゼ(EC: 1. 1. 3. 10)、インペルターゼおよびスクロースフオリラーゼを固定化した酵素電極を用い、試料溶液にスクロースを共存せしめ測定することの特徴とするリン酸濃度測定方法である。

この電極は比較的耐久性に優れた酵素により構成されており、安定で、かつ使用する試薬も低価格なものである。

作 用

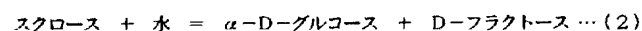
スクロースフオリラーゼはシユードモナス(Pseudomonas)属やロイコノストック(Leuconostoc)属等の細菌が生産することが知られている酵素である。この酵素は下記に示す反応を触媒する。

スクロース + 無機リン酸 =

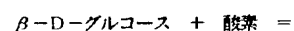
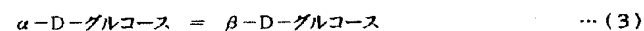


この式において、無機リン酸がスクロースの分解に関与することがわかる。つまり過剰のスクロースが存在する系にリン酸が添加されると、(1)式によりスクロースは、D-フラクトースと $\alpha$ -D-グルコース-1-リン酸に分解される。

一方、リン酸がない場合は、スクロースは以下に示す反応系により加水分解される。



ここで生じた $\alpha$ -D-グルコースは、以下の反応により、酸化分解される。



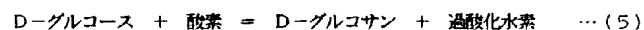
ここで、(2)式に関与する酵素はインペルターゼ、(3)式に関与する酵素はムタロターゼ、そして(4)式に関与する酵素がグルコースオキシダーゼである。

最終的に(4)式で示されるグルコースオキシ

ダーゼにより触媒される反応で消費される酸素を測定するか、生成される過酸化水素を測定する。

つまりリン酸の有無により、スクロースの分解反応の経路が変化するわけであり、スクロース存在系における定常出力は、リン酸の添加により減少する方向になる。

また(3)、(4)式に示される反応を触媒する酵素であるムタロターゼとグルコースオキシダーゼのかわりに、(5)式の反応を触媒するピラノースオキシダーゼを用いても測定が可能である。



スクロースフオリラーゼは、その至適pHが6.0から7.0付近であり、共に用いるグルコースオキシダーゼ、ムタロターゼ、インペルターゼおよびピラノースオキシダーゼも無理なく利用できるpH範囲にある。

本酵素電極は数種類の酵素が共同して作用するため、その反応速度論的解析の詳細を検討することは容易ではない。しかし定性的には以下のように考えられる。ムタロターゼとグルコースオキシ

ダーゼあるいはピラノースオキシダーゼの活性がインペルターゼの活性に比べて充分大きければインペルターゼの触媒作用により生じたグルコースは速やかに分解され、反応の律速段階はスクロースの分解過程(2)式にあることになる。一方で、系内にリン酸が加えられるとスクロースはグルコース-1-リン酸とフラクトースに加水分解されるが、もしスクロースフオスフオリラーゼの活性がインペルターゼより高ければ、系内にリン酸が加えられた影響が強く現れる。したがってリン酸を高感度で測定するためには、スクロースフオスフオリラーゼの活性がインペルターゼの活性より高くなるように酵素の活性比を調整することが望ましい。

本発明で用いる試薬はスクロースだけであり、極めて安価に分析が実施できる。

本発明に係わる酵素電極は、その原理からわかるように、グルコースにも感応する。グルコースが含まれる試料を測定する場合には、まずスクロースを添加しない時の出力値を記録しておき、次

に添加した場合の出力値との差から正確なリン酸の定量が可能である。また、試料中にスクロースが含まれる場合にも、予めブランク値を計測しておくことにより補正が可能である。

電極の作成方法としては、グルコースオキシダーゼ、ムタロターゼ、インペルターゼ、およびスクロースフオスフオリラーゼを適当な緩衝液、たとえばpH7.0のリン酸緩衝液に溶解しこれに架橋剤、たとえばグルタルアルデヒド等の多官能基性アルデヒドを混合し、白金、カーボン等の電極上、もしくは選択透過膜上に塗布して乾燥架橋すればよい。この時、架橋膜の強度を上昇させるためにアルブミン等の他のタンパク質やポリマーを共存させることもできる。

このように作成した酵素電極はバッチ系で使用してもよいし、フロー型計測装置に組み込んで使用することもできる。また酸素の減少量、過酸化水素の増加量のいずれをモニターしてもよい。

なお測定時の緩衝液は、リン酸を全く含まない方が感度的には有利であるが、特に過酸化水素を

検出する場合S/N比を向上するためには、リン酸緩衝液の利用が望ましく、この場合1mM~10mM程度のリン酸緩衝液ならば使うことができる。

#### 実施例

以下に実施例を示し本発明をより具体的に説明するが、もちろん本発明はこれのみに限定されるものではない。なお、%は重量%を表す。

#### 実施例1

##### (1)電極の作成方法

直径2mmの白金線の側面を熱収縮テフロンで被覆し、その線の一端をやすりおよび1500番のエメリー紙で平滑に仕上げる。この平滑に仕上げた白金線上に酵素を固定化した。グルコースオキシダーゼ(シグマ社製、Type VII-S)0.2mg、インペルターゼ(シグマ社製、Grade VII)1.0mg、ムタロターゼ(シグマ社製)1μl、スクロースフオスフオリラーゼ(シグマ社製)6.0mg、および牛血清アルブミン(シグマ社製、Fraction V)7.0

mgを100mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH7.0)1mlに溶解しその中にグルタルアルデヒドを0.5%になるように加える。この混合液を手早く先に用意した白金線の研磨平滑化した端面に3μlのせ、風乾する。その後、10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH6.5)中に保存する。

##### (2)測定方法

作成した酵素電極を作用電極、1cm角の白金板状電極を対極とし、参照電極として飽和カロメル電極(以下、SCEと略す)を用いこれらをポテンシオスタットに接続した。作用電極に対SCE0.6Vの電圧を印加して測定系を構成した。測定に用いた緩衝液は10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH6.5)である。測定温度は37℃(±0.2℃)とした。マグネチックスターラーで溶液を攪拌しながら、系内にスクロースを1mM加えた。スクロースの分解および生成したグルコースの酸化に伴って生じる過酸化水素の酸化電流が安定化するのを待つて、リン酸溶液を10mM

から100 mMとなるように順次添加し、酸化電流に由来する出力値の減少をレコーダーに記録した。この記録結果が第1図である。スクロースを加えると(図中①の点)速やかに電流が増大し一定値に落ち着く。そこにリン酸を加えると(図中②の点)、電流値が減少することがわかる。そして、溶液内のリン酸濃度に対して出力減少値をグラフ化したものが第2図である。リン酸濃度0～50 mMに対して良好な直線性を有する検量線が得られていることがわかる。

#### 発明の効果

本発明により、リン酸の分析を簡便・迅速に実施でき、かつ分析に要する費用を著しく削減することが可能となった。

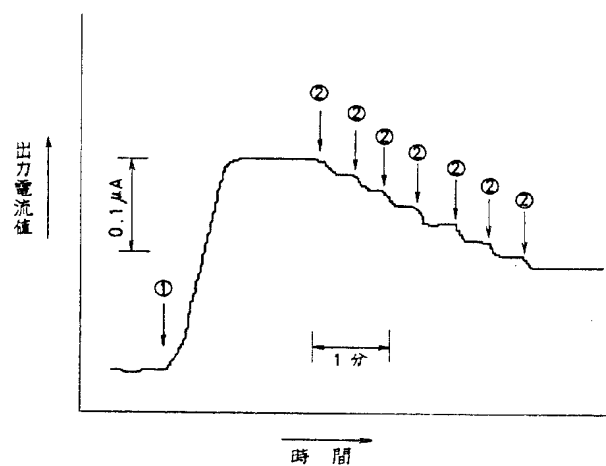
#### 4. 図面の簡単な説明

第1図は測定の実施例であり、横軸は時間、縦軸は出力電流値を示している。矢印の時点で各々スクロース(①)とリン酸(②)を加えている。

第2図はリン酸の検量線である。

代理人 弁理士 西教 圭一郎

第1図



第2図

